

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	20 JUN 2000
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

EP00/03949

ESY

Die Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG in Frankfurt am  
Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Spleißosomprotein und seine Verwendung"

09/980372

am 4. Juni 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Februar 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

*Jaume*

Aktenzeichen: 199 25 668.3

Waasmaier



## Spleißosomprotein und seine Verwendung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spleißosomprotein, das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und für dieses Spleißosom spezifisch ist. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung dieses Proteins und der hierfür codierende DNA-Sequenzen bei der Diagnostik von Autoimmunkrankheiten und von Krankheiten, die auf Defekten des Spleißapparats beruhen.

10

Zahlreiche eukaryontische Protein- oder auch RNA-codierende Gene sind mosaikartig zusammengesetzt, wobei sich einzelne, für Teilbereiche des Genprodukts codierende Sequenzen (Exons) und intervenierende, nicht für das Genprodukt codierende Sequenzen (Introns) abwechseln. Die Primärtranskripte solcher Mosaikgene enthalten daher in ihrer RNA-Kette sowohl die von den Exons als auch die von den Introns codierten Sequenzen und müssen für eine korrekte Genexpression erst noch prozessiert werden.

20

Einer der wesentlichen Prozessierungsschritt ist das Spleißen, das im Zellkern erfolgt. Im Falle der Expression von Protein-codierenden Genen werden hierbei aus längerkettigen Primärtranskripten, der sog. prä-mRNA, unter Bildung von reifer mRNA Introns entfernt. Der Spleißvorgang wird durch Exon-RNA-Sequenzen miteinander verknüpft. Der Spleißvorgang wird durch ein sogenanntes Spleißosom, einen großen Ribonucleoprotein-Komplex, katalysiert, der sich stufenweise aus mehreren kleinen nucleären Ribonucleinprotein-Partikeln (small nuclear RNPs, snRNPs), die ihrerseits aus Uridin-reichen RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs) und spezifisch an diese bindenden Proteinen bestehen, und aus nicht fest an diese snRNPs gebundenen Proteinen, den sog. nicht-snRNP-Spleißfaktoren, zusammenlagert. Das Spleißen erfolgt im allgemeinen nach einem zweistufigen Mechanismus, wobei in jeder Stufe ein Transesterifizierungsschritt beteiligt ist. Im ersten Schritt wird nach Bindung des Spleißosoms an die 5'-Spleißstelle und die sog. Verzweigungsstelle im Intron ein freies 5'-Exon und eine sog. Lariat-Struktur des Introns generiert, wobei das Intron noch mit dem 3'-Exon

35



verbunden ist. Im zweiten Schritt werden dann die beiden Exons ligiert und das Intron freigesetzt.

5

Die Mehrzahl der Introns von prä-mRNA in Metazoen besitzt an den Enden invariable GU- und AG-Dinucleotide. Diese Introns werden durch das sog. GT-AG-Spleißosom (oder major Spleißosom), das diese Dinucleotide erkennt, ausgeschnitten. Das Spleißosom enthält die U1, U2, U5 und U4/U6 snRNPs, die sich aus einer (U1, U2, U5) oder zwei (U4/U6) RNAs und zahlreichen Proteinen, beispielsweise Proteinen der Sm-Klasse zusammensetzen. Die Erkennung von Spleiß- und Verzweigungsstelle der sog. U2-abhängigen Introns durch das Spleißosom erfolgt mittels Wechselwirkungen, bei denen sowohl RNA als auch Proteine beteiligt sind. So wird die Duplexbildung zwischen U1 snRNA und 5'-Spleißstelle durch verschiedene Polypeptide, wie das 70K- und das C-Protein des U1 snRNPs sowie Proteine der Familie der Ser- und Arg-reichen SR-Proteine, erleichtert. Die Basenpaarung zwischen U2-snRNA und der Verzweigungsstelle erfordert in ähnlicher Weise zahlreiche U2-snRNP-Proteine, insbesondere die Untereinheiten der heteromeren Spleißfaktoren SF3a und SF3b [R. Reed, Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 215 (1996); C.L. Will und R. Lührmann, Curr. Opin. Cell Biol. 9, 320 (1997); A. Krämer, Annu. Rev. Biochem. 65:367 (1996)]

20

In jüngerer Zeit konnte ein alternatives Spleißosom, das sog. AT-AC-Spleißosom, identifiziert werden, das sich aus den U11, U12, U5 und U4atac/U6atac snRNPs zusammensetzt und eine seltene Klasse von mRNA-Introns spleißt, die an ihren Termini AU- und AC-Dinucleotide aufweisen [C.B. Burge et al. In: The RNA World II, R.F. Gesteland und J.F. Atkins, Hrsg., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N.Y., 1999, p. 525]. Diese sog. U12-abhängigen Introns werden im Vergleich mit den U2-abhängigen Introns nur mit geringer Häufigkeit angetroffen und enthalten hochkonservierte Sequenzelemente an der 5'-Spleißstelle und der Verzweigungsstelle, die sich von den schwach konservierten Sequenzen der U2-abhängigen prä-mRNA-Introns unterscheiden [C.B. Burge et al. In: The RNA World II, R.F. Gesteland und J.F. Atkins, Hrsg., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N.Y., 1999, p. 525; S.L. Hall und R.A. Padgett, J. Mol. Biol. 239:357 (1994); P.A. Sharp und C.B. Burge, Cell 91:875 (1997)]. Während der Zusammenlagerung des AT-AC-Spleißosoms bindet das U11-snRNP durch Basenpaarung mit der 5'-Spleißstelle und das U12-snRNP mit der Verzweigungsstelle [S.L. Hall und

35



R.A.Padgett, Science 271:1716 (1996); W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Cell 84:801 (1996); W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6030 (1997); I Kolosova und R.A. Padgett, RNA 3:227 (1997)). Anschließend erfolgt die Bildung des reifen Spleißosoms durch Assoziation der U5- und U4atac/U6atac-snRNPs [W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Science 273:1824 (1996)]. Die U11- und U12-snRNPs liegen in Kernextrakten als hochstabile 18S-U11/U12-Komplexe vor [K.M. Wassarman und J.A. Steitz, Mol. Cell Biol. 8, 1276 (1992)], und jüngere in-vitro-Bindungsstudien lassen vermuten, daß U11 und U12 mit der prä-mRNA als vorgebildeter Komplex in Wechselwirkung treten [M. Fritlander und J.A. Steitz, Genes & Dev. 13:851 (1999)]. Diese Beobachtungen lassen zusammen mit der Tatsache, daß Introns vom U12-Typ nicht den wesentlichen Pyrimidintrakt der 3'-Spleißstelle der Hauptklasse-Introns aufweisen, vermuten, daß zwischen den Mechanismen der Spleißstellenerkennung bei den verschiedenen Spleißosomen Unterschiede bestehen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der für das AT-AC-Spleißosom charakteristischen Proteine könnte daher nicht nur Aufschluß über den genauen Mechanismus der in diesem Spleißosom ablaufenden Spleißvorgänge liefern, sondern gleichzeitig eine Diagnose und Therapie von Krankheiten ermöglichen, die auf Störungen im Spleißmechanismus dieses Spleißosoms zurückzuführen sind. Die Bereitstellung spezifischer Proteine ermöglicht ferner das Auffinden und die Entwicklung potentieller Spleißmodulatoren, die ebenfalls vorteilhaft bei der Behandlung von durch Störungen des Spleißvorgangs bedingten Erkrankungen eingesetzt werden können

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein für das AT-AC-Spleißosom charakteristisches Protein bereitzustellen.

Diese Aufgabe konnte durch ein Spleißosomprotein gelöst werden, das mit dem 18S U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und spezifisch für dieses Spleißosom ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, welches durch eine DNA-Sequenz codiert wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus



a) DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3 codieren;

b) DNA-Sequenzen, die mit den zu den Sequenzen unter a) komplementären Sequenzen hybridisieren und befähigt sind, ein Protein mit der Funktion des 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes zu codieren; und

c) DNA-Sequenzen, die in ihrem genetischen Code bezüglich der unter a) oder b) genannten Sequenzen degeneriert sind;

Unter „Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins“ ist hierbei jedes Protein zu verstehen, das im wesentlichen die Eigenschaften des natürlich vorkommenden, insbesondere des humanen, 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes besitzt, also im Spleißosomkomplex die korrekte Funktion des genannten Spleißosoms gewährleistet.

Der Begriff Hybridisierung bedeutet hier eine Hybridisierung unter üblichen Hybridisierungsbedingungen, insbesondere unter stringenter Hybridisierungsbedingungen, wie sie dem Fachmann bekannt sind [vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Bevorzugt besitzt das Spleißosomprotein die Aminosäuresequenz nach Fig. 3. Das Protein kann jedoch auch ein oder mehrere Aminosäuredeletionen, Aminosäureaustausche oder Aminosäureadditionen oder -insertionen aufweisen, solange die Funktion des Proteins dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Beispielsweise kann das Spleißosomprotein auch mit fremden Proteinsequenzen fusioniert sein.

Das bevorzugte erfindungsgemäße Spleißosomprotein mit einer Länge von 246 Aminosäuren besitzt ein apparentes Molekulargewicht, bestimmt durch SDS-Page, von ungefähr 35kD und ein berechnetes Molekulargewicht von 29kD und einen isoelektrischen Punkt von 9,88.



Ein weiterer Gegenstand sind die für dieses Protein codierenden DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, zu diesen Sequenzen komplementäre Sequenzen, sowie Fragmente davon.

5 Diese DNA-Sequenzen mit können mit anderen DNA-Sequenzen, insbesondere Sequenzen, die die Expression des Proteins in einem gewünschten Wirtsorganismus ermöglichen, verknüpft werden. Solche Sequenzen sind im Stand der Technik bekannt. Es handelt sich hierbei beispielsweise um regulatorische Sequenzen wie Promotorsequenzen, Shine-Dalgarno-Sequenzen, Transkriptionsterminationssignale, Polyadenylierungssignale oder Enhancer-Elemente. Auf diese Weise läßt sich das gewünschte Protein kostengünstig in großen Mengen gewinnen.

15 Gegenstand der Erfindung sind daher auch rekombinante DNA-Moleküle, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten.

Die rekombinanten DNA-Moleküle können entweder direkt in den gewünschten Wirtsorganismus eingeschleust werden oder zuerst in Vektoren eingebaut werden, mit denen die Wirtsorganismen anschließend in an sich bekannter Weise transformiert werden. Solche Vektoren sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Als Vektoren können die im Stand der Technik üblichen Vektoren, beispielsweise Plasmide, Bakteriophagen oder Viren, verwendet werden. Bevorzugte Vektoren sind Expressionsvektoren.

25 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Wirtsorganismen, die die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle oder Vektoren enthalten.

Geeignete Wirtsorganismen sind beispielsweise prokaryontische oder eukaryontische Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien wie *Escherichia Coli*, Hefen oder Gewebezellen.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Fragmente davon können dazu verwendet werden, homologe DNA-Sequenzen in verschiedenen Organismen oder Gewebetypen aufzufinden, die eine ähnliche oder gleiche Funktion wie das erfindungsgemäße Spleißosomprotein besitzen.



Das erfindungsgemäße Protein und die für dieses Protein codierenden DNA-Sequenzen lassen sich ferner vorteilhaft als Diagnostika, beispielsweise für Autoimmunkrankheiten und von Erkrankungen, die auf Störungen im Spleißmechanismus zurückzuführen sind.

5 So ist es bekannt, daß Spleißosomkomponenten als Autoantigene wirken können. Patienten, die von der Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus erythematoses betroffen sind, produzieren beispielsweise häufig Antikörper, mit denen die meisten snRNPs präzipitierbar sind. Das erfindungsgemäße Protein eröffnet nunmehr auf dem Wege eines einfachen Immunassays eine Möglichkeit zur raschen Diagnose von Autoimmunerkrankungen, die auf einer Bildung von Antikörpern gegen Proteine beruhen, die für das AT-AC-Spleißosom spezifisch sind.

15 Krankheiten, die auf Störungen im Spleißmechanismus des AT-AC-Spleißosoms zurückzuführen sind, die auf einem Defekt im 35kD-Proteins beruhen, lassen sich beispielsweise mit Hilfe von Komplementationstests in im Stand der Technik bekannten in-vitro-Spleißsystemen diagnostizieren. Hierbei wird beispielsweise durch in-vitro-Transkription zunächst eine prä-mRNA mit einem U12-abhängigen Intron hergestellt, das sämtliche Strukturelemente enthält, die für die Erkennung der prä-mRNA durch das Spleißosom und für den Spleißvorgang notwendig sind. Die RNA wird beispielsweise radioaktiv markiert, damit später nach Auftrennung auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgrund der charakteristischen Bandenmuster bei

25 werden kann, ob eine Spleißreaktion stattgefunden hat. Anschließend werden Proben aus Patientengewebe mit und ohne Zusatz des erfindungsgemäßen 35kD-Proteins getestet. Eine Komplementation weist dann den Defekt in besagtem Protein nach.

30 Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können im Wege üblicher Hybridisierungstests zur Diagnose von Defekten im Gen für das beschriebene 35kD-Protein eingesetzt werden, insbesondere bei der pränatalen Diagnostik.

Das erfindungsgemäße Protein kann ferner als Therapeutikum bei auf Spleißdefekten beruhenden Erkrankungen verwendet werden.

5       Ferner läßt sich das erfindungsgemäße Spleißosomprotein vorteilhaft zum Auffinden oder Entwickeln von Spleißomodulatoren, z.B. Spleißinhibitoren, verwenden, die dann zur Behandlung weiterer Krankheiten geeignet sind. So wurden jüngst U12-abhängige Introns in den mutanten Genen identifiziert, die für das autosomal rezessive Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) verantwortlich sind. Es ist zu erwarten, daß solche Introns in Zukunft auch noch in weiteren Genen gefunden werden, denen ein Rolle bei genetisch bedingten Erkrankungen zugeschrieben werden kann. Eine gezielte Inhibierung des Spleißens der in solchen Genen vorhandenen Introns und damit der Expression der schädlichen mutierten Gene stellt daher einen möglichen Weg zur Therapie der genannten Krankheiten dar. Wegen des seltenen Vorkommens der U12-abhängigen Introns können solche Spleißinhibitoren bei AT-AC-Spleißosomen auch therapeutisch wirksamer eingesetzt werden als bei GT-AG-Spleißosomen.

15       Zur Auffindung der gesuchten Spleißomodulatoren können die bereits oben erwähnten, bekannten in-vitro-Testsysteme zur Untersuchung von Spleißmechanismen verwendet werden. Spleißomodulatoren oder -inhibitoren, die sich auf diese Weise analysieren lassen, sind beispielsweise monoclonale Antikörper. So wurde die Beeinflussung von Spleißvorgängen in der Zelle mit Hilfe von Antisera oder monoclonalen Antikörpern, beispielsweise der Generierung reifer mRNA, bereits beschrieben [R.A. Padgett et al, Cell 35:10 (1983); R. Gattoni et al, Nucleic Acid Res. 24:2535 (1996)].

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt die snRNA-Zusammensetzung gereinigter snRNPs.

30       Fig. 2 zeigt die Proteinzusammensetzung von mit Oligonucleotiden selektierten U11/U12 snRNPs.

Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des U11/U12-assoziierten 35kD-Proteins zusammen mit der codierenden DNA-Sequenz

Fig. 4 zeigt die gesamte cDNA-Sequenz für das U11/U12-assoziierte 35kD-Protein einschließlich nicht-codierender Sequenzen. Die codierende Sequenz mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist unterstrichen.

5       Die Isolierung des erfindungsgemäßen U11/U12-assoziierten 35kD-Proteins wird im folgenden beispielhaft erläutert.

Beispiele

Präparation von HeLa-Kernextrakten

15       Zur Herstellung von Kernextrakten aus HeLa-Zellen wurden Zellkulturen mit HeLa-Zellen kultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000 x g, 10 Min.) aus dem Kulturmedium sedimentiert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in fünf-fachem Volumen Puffer A (10mM HEPES, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5 mM DTT, pH 7,9, 4 °C) aufgenommen und 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und in zweifachem Volumen Puffer A aufgenommen. Diese Suspension wurde mit einem Dounce Homogenisator (Pistill B) aufgeschlossen (10-faches Auf- und Abbewegen des Pistills). Die Kerne wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Kerne erneut in Puffer A aufgenommen und für 20 Minuten bei 25.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml Puffer B (20 mM HEPES, 25 % (v/v) Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,5 mM DTT, pH 7,9) aufgenommen und erneut mit dem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Die entstehende Suspension wurde 30 Minuten auf einem Magnetprüher inkubiert und anschließend bei 25.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Erneut schloß sich eine Zentrifugation bei 25.000 x g (30 Min.) an. Der klare Überstand wurde gegen das 50-fache Volumen Puffer C (20 mM HEPES, 20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,9) dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert (25.000 x g, 20 Min.). Der resultierende Überstand kann als Kernextrakt in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Dignam, J. D. et al. (1983) Nucleic Acid Res., 11, 1475).

## Isolierung und Analyse von snRNPs

Spliceosomale snRNPs, die zuvor mit einem Trimethylguanin (m3G)-Cap versehen worden waren, wurden aus Kernextrakten von HeLa-Zellen durch Immunitäts-Chromatographie mit anti-m3G-Antikörpern gereinigt und durch Sedimentation durch einen 10-30%igen Glyceringradienten fraktioniert (B. Lagerbauer, J. Lauber und R. Lührmann, Nucleic Acids Res. 24:868 (1996)). Fraktionen, die die 18 S U11/U12 snRNP-Komplexe enthielten, wurden gepoolt und die KCl-Konzentration auf 250 mM eingestellt. Die snRNPs von 2,4 ml der gepoolten 18S-Gradientenfraktionen wurden 16h bei 4°C mit 12 µg Oligonukleotid, das entweder zu den Nukleotiden 2-18 von humaner U11 snRNA, 5'ACGACAGAGCCUUUdT<sup>+</sup>dT<sup>+</sup>dT<sup>+</sup>·3' (U11-Oligo), oder zu den Nukleotiden 11-28 von humaner U12 snRNA, 5'-AUUUUUUUUUACUCAAGdT<sup>+</sup>dT<sup>+</sup>dT<sup>+</sup>·3' (U12-Oligo), komplementär ist, inkubiert, wobei \* ein biotinyliertes 2'-Deoxythymidin und A, U, G und C 2'-O-methylribonucleotide bedeuten. Die Oligonukleotid-gebundenen snRNPs wurden mit Streptavidin-Agarose in an sich bekannter Weise präzipitiert [A.I. Lamond und B.S. Sproat, in RNA Processing: A Practical Approach, D. Rickwood und B.D. Hames, Hrsg. (Oxford University Press, Oxford, 1996) p. 103]. Die RNA aus 1/5 der Agarose-präzipitierten snRNPs wurde durch 30-minütige Inkubation bei 95°C in 100 µl DH-Puffer (15 mM NaCl, 1,5 mM NaCitrat, 0,1 % SDS) eluiert, auf 10%igen Polyacrylamid-7M-Harnstoff-Gelen fraktioniert und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Identität der selektierten RNAs als U11 und U12 wurde durch Northern-Blotting bestätigt. Von den restlichen Kugelnchen wurde das Protein durch 5-minütige Inkubation bei 95°C in 200 µl S-Puffer (60 mM Tris, pH 6,8, 1 mM EDTA, 17,5% Glycerin, 2% SDS, 0,2 M DTE) eluiert und mit 5 Volumeneinheiten Aceton präzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE auf Gelen mit 10% (obere Hälfte) und 13% (untere Hälfte) Polyacrylamid fraktioniert und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden auch RNA und Protein aus 50 µl des Auscansmaterials (gepoolte 18S-Gradientenfraktionen) analysiert.

Die Ergebnisse für das U11-Oligo sind in Fig. 1, Spur 2, diejenigen für das U12-Oligo in Fig 1, Spur 3, dargestellt. Spur 1 zeigt die snRNAs des Ausgangsmaterials (Input); Spur 4 zeigt die Kontrolle der Präzipitation in Abwesenheit von Oligonucleotiden (Mock). Die Koselektion von U12 mit einem

gegen U11 gerichteten Oligonucleotid und umgekehrt zeigte, daß hauptsächlich U11/U12 snRNP-Komplexe und nicht U11- oder U12-Monopartikel selektiert worden waren. Dementsprechend zeigt Fig. 2, Spuren 2 und 3, identische Proteinmuster der U11/U12 snRNPs, unabhängig davon, mit welchem Oligonucleotid diese selektiert worden waren. Das Molekulargewicht der Proteine (in kD) ist rechts angegeben. Spur 1 zeigt wiederum die Proteine des Ausgangsmaterials (Input) und deren Identität (linke Seite). Spur 4: Kontrolle.

10 Identifizierung von mit dem U1/U12 snRNP-Komplex assoziierten Proteinen

15 Von den 20 unterschiedlichen im U11/U12-Komplex gefundenen  
proteinen migrierten 8 mit den Sm snRNP-Kernproteinen B', B, D3, D2, D1, E,  
F, und G, die in den snRNPs des major Spleißosoms anwesend sind (Fig. 2,  
Spuren 1-3). Antikörper, die spezifisch mit B'/B, D3, D2, F oder G reagierten,  
erkannten auch die Proteine identischen Molekulargewichts auf Immunoblots  
des U11/U12-Komplexes. U11/U12 enthält daher dieselben 8 Sm-Proteine, die  
auch im major Spleißosom gefunden werden.

Von den 12 restlichen U11/U12 Proteinen migrierten die 160kD-, 150kD-, 130kD- und 49kD-Proteine des U11/U12-Komplexes mit vier der für den 17S U2-Komplex spezifischen Proteine, die den essentiellen Spleißfaktor SF3b ausmachen, nämlich U2-160, U2-150, U2-120 und U2-53. Antikörper gegen U2-160, U2-150 und U2-120 gerichtet waren, reagierten außerdem stark mit den 160kD-, 150kD und 130kD-Proteinen des U11/U12-Komplexes. Peptidsequenzen, die durch Mikrosequenzierung der 160kD-, 150kD-, 130kD- und 49kD-Proteine des U11/U12-Komplexes erhalten worden waren (Tabelle I), erwiesen sich als im wesentlichen identisch mit den bekannten Sequenzen von SF3b. Die genannten vier Proteine sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den aus SF3b bekannten Proteinen identisch, wobei Abweichungen in den apparenten Molekulargewichten einiger der comigrierenden Proteine auf Unterschiede in den Elektrophoresbedingungen zurückzuführen sind, die bei der ursprünglichen Identifizierung der U2 snRNP-Proteine angewandt wurden.



Tabelle I

U11/U12 Protein	Peptide
160kD	KMNARTYMDVMREQHLTK KLATPTPLGGMTGF KAINNVIGMH
150kD	KRIFEAFK KLRRMNRFTVAE KRTGIQEMREALQEK KLTIHGDLYYEG
130kD	KLGAVFNQVAFPLQYT KLLRVYDLGK KNVSEELDRTPPEVSK KLENIAGRYAF
49kD	KVSEPLLXELFLQ KDRVTDGHHQGYGFVEFLSEE

X bedeutet hierbei eine beliebige Aminosäure

Charakterisierung des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex assoziierten 35kD-Proteins

Von den restlichen Proteinen wurde das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex assoziierte 35kD-Protein charakterisiert. Hierzu wurden durch Mikrosequenzierung von dem gefraktionierten, Trypsin-verdauten 35kD-Protein die Peptide KEYDPLK und KRWQEREPTRVWPDND erhalten. Mit diesen Peptiden wurde mittels des TBLASTN-Programms in der EST-Datenbank des National Center for Biotechnology Information eine Suche nach cDNAs durchgeführt. Beide Peptide wurden in einem ORF einer cDNA aus humanen Makrophagenzellen (Genbank-Accession-No. U44798), die für ein unbekanntes Protein codierte, gefunden. Eine zweite cDNA aus humanen

Muskelzellen mit einem identischen ORF (Genbank-Accession No. AA211268) in pBluescript SK wurde nach Transformation in E.coli HB101 mit einem ABI PRISM-Sequenzanalyser vollständig sequenziert. Die für das 35kD-Protein codierende DNA-Sequenz ist in Fig. 3 zusammen mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz wiedergegeben. Fig. 4 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz einschließlich nicht-codierender 5'- und 3'-Sequenzen.

Von der cDNA wurde durch in-vitro-Translation Protein hergestellt (TNT (Coupled Transcription/Translation)-Kit der Fa. Promega). Das Protein migrierte auf einem SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit dem gereinigten 35kD-Protein, was zeigte, daß die DNA vollständiges Protein codierte.

Das U11/U12-35kD-Protein besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM; Aminosäuren 51-129). Diese Region und die benachbarte Glycin-reiche Region sind sehr ähnlich zu einer Region des U1-70K-Proteins. Antisera gegen das 35kD-Protein präzipitierten darüber hinaus effizient U11 aus einer Mischung von durch einen Gradienten fraktionierten snRNPs, die U11-Monopartikel enthielten. Analog zu U1-70K dürfte das U11-35kD-Protein daher die Erkennung der 5'-Spleißstelle erleichtern. Ferner dürfte das Protein in Wechselwirkung mit Komponenten des major Spleißosoms an der Exonverknüpfung beteiligt sein.



### Patentansprüche

1. DNA-Sequenz codierend für ein Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3 codieren;
  - b) DNA-Sequenzen, die mit den zu den Sequenzen unter a) komplementären Sequenzen hybridisieren und befähigt sind, ein Protein mit den funktionellen Eigenschaften des 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes zu codieren; und
  - c) DNA-Sequenzen, die in ihrem genetischen Code bezüglich der unter a) oder b) genannten Sequenzen degeneriert sind;
 sowie Fragmente dieser Sequenzen und die zu den unter a), b) und c) genannten Sequenzen oder den Fragmenten davon komplementären Sequenzen.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, umfassend die Nukleotidsequenz nach Fig. 3 oder Fig. 4, hierzu komplementäre Sequenzen sowie Fragmente dieser Sequenzen.
3. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2.
4. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 3, worin die für das Spleißosomprotein codierende DNA mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression des Proteins in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen ermöglichen.
5. Vektor, enthaltend eine Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 oder ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4.



6. Wirtsorganismus, enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül nach irgendeinem der Ansprüche 3 oder 4 oder einen Vektor nach Anspruch 5.
7. Wirtsorganismus nach Anspruch 6, welcher ein prokaryontischer Mikroorganismus ist.
8. Wirtsorganismus nach Anspruch 6, welcher ein eukaryontischer Mikroorganismus ist.
9. Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplexes des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, welches durch eine der Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird.
10. Spleißosomprotein nach Anspruch 9, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) einem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3;
  - b) einem Polypeptid, das im Vergleich mit der Sequenz nach a) eine oder mehrere Aminosäuredeletionen, Aminosäureaustausche, Aminosäureadditionen und/oder Aminosäureinsertionen aufweist.
11. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon zur Isolierung homologer DNA- oder RNA-Sequenz
12. Verwendung eines Spleißosomproteins nach Anspruch 9 zum Auffinden von Spleißomodulatoren.
13. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 und/oder eines Spleißosomproteins nach Anspruch 9 zur Herstellung von Diagnostika.
14. Spleißosomprotein nach Anspruch 9 als Therapeutikum und/oder Diagnostikum.





Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Spleißosomprotein, das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und für dieses Spleißosom spezifisch ist. Dieses Protein und die hierfür codierende DNA-Sequenz können bei der Diagnostik bestimmter Autoimmunkrankheiten und von Krankheiten verwendet werden, die auf Defekten im Spleißapparat beruhen.

10

Fig. 3

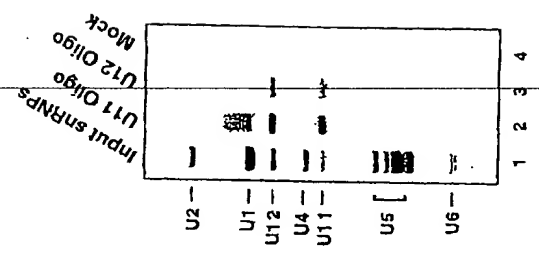


Fig. 1



Fig. 2

Fig. 3

1/1  
 31/11  
 61/21  
 91/31  
 181/61  
 271/91  
 361/121  
 451/151  
 541/181  
 631/211  
 721/241  
 811/271  
 901/301  
 991/331  
 1081/361  
 1171/391  
 1261/421  
 1351/451  
 1441/481  
 1531/511  
 1621/541  
 1711/571  
 1801/601  
 1891/631  
 1981/661  
 2071/691  
 2161/721  
 2251/751  
 2341/781  
 2431/811  
 2521/841  
 2611/871  
 2701/901  
 2791/931  
 2881/961  
 2971/991  
 3061/1021  
 3151/1051  
 3241/1081  
 3331/1111  
 3421/1141  
 3511/1171  
 3601/1201  
 3691/1231  
 3781/1261  
 3871/1291  
 3961/1321  
 4051/1351  
 4141/1381  
 4231/1411  
 4321/1441  
 4411/1471  
 4501/1501  
 4591/1531  
 4681/1561  
 4771/1591  
 4861/1621  
 4951/1651  
 5041/1681  
 5131/1711  
 5221/1741  
 5311/1771  
 5401/1801  
 5491/1831  
 5581/1861  
 5671/1891  
 5761/1921  
 5851/1951  
 5941/1981  
 6031/2011  
 6121/2041  
 6211/2071  
 6301/2101  
 6391/2131  
 6481/2161  
 6571/2191  
 6661/2221  
 6751/2251  
 6841/2281  
 6931/2311  
 7021/2341  
 7111/2371  
 7201/2401  
 7291/2431  
 7381/2461  
 7471/2491  
 7561/2521  
 7651/2551  
 7741/2581  
 7831/2611  
 7921/2641  
 8011/2671  
 8101/2701  
 8191/2731  
 8281/2761  
 8371/2791  
 8461/2821  
 8551/2851  
 8641/2881  
 8731/2911  
 8821/2941  
 8911/2971  
 9001/3001  
 9091/3031  
 9181/3061  
 9271/3091  
 9361/3121  
 9451/3151  
 9541/3181  
 9631/3211  
 9721/3241  
 9811/3271  
 9901/3301  
 9991/3331  
 10081/3361  
 10171/3391  
 10261/3421  
 10351/3451  
 10441/3481  
 10531/3511  
 10621/3541  
 10711/3571  
 10801/3601  
 10891/3631  
 10981/3661  
 11071/3691  
 11161/3721  
 11251/3751  
 11341/3781  
 11431/3811  
 11521/3841  
 11611/3871  
 11701/3901  
 11791/3931  
 11881/3961  
 11971/3991  
 12061/4021  
 12151/4051  
 12241/4081  
 12331/4111  
 12421/4141  
 12511/4171  
 12601/4201  
 12691/4231  
 12781/4261  
 12871/4291  
 12961/4321  
 13051/4351  
 13141/4381  
 13231/4411  
 13321/4441  
 13411/4471  
 13501/4501  
 13591/4531  
 13681/4561  
 13771/4591  
 13861/4621  
 13951/4651  
 14041/4681  
 14131/4711  
 14221/4741  
 14311/4771  
 14401/4801  
 14491/4831  
 14581/4861  
 14671/4891  
 14761/4921  
 14851/4951  
 14941/4981  
 15031/5011  
 15121/5041  
 15211/5071  
 15301/5101  
 15391/5131  
 15481/5161  
 15571/5191  
 15661/5221  
 15751/5251  
 15841/5281  
 15931/5311  
 16021/5341  
 16111/5371  
 16201/5401  
 16291/5431  
 16381/5461  
 16471/5491  
 16561/5521  
 16651/5551  
 16741/5581  
 16831/5611  
 16921/5641  
 17011/5671  
 17101/5701  
 17191/5731  
 17281/5761  
 17371/5791  
 17461/5821  
 17551/5851  
 17641/5881  
 17731/5911  
 17821/5941  
 17911/5971  
 18001/6001  
 18091/6031  
 18181/6061  
 18271/6091  
 18361/6121  
 18451/6151  
 18541/6181  
 18631/6211  
 18721/6241  
 18811/6271  
 18901/6301  
 18991/6331  
 19081/6361  
 19171/6391  
 19261/6421  
 19351/6451  
 19441/6481  
 19531/6511  
 19621/6541  
 19711/6571  
 19801/6601  
 19891/6631  
 19981/6661  
 20071/6691  
 20161/6721  
 20251/6751  
 20341/6781  
 20431/6811  
 20521/6841  
 20611/6871  
 20701/6901  
 20791/6931  
 20881/6961  
 20971/6991  
 21061/7021  
 21151/7051  
 21241/7081  
 21331/7111  
 21421/7141  
 21511/7171  
 21601/7201  
 21691/7231  
 21781/7261  
 21871/7291  
 21961/7321  
 22051/7351  
 22141/7381  
 22231/7411  
 22321/7441  
 22411/7471  
 22501/7501  
 22591/7531  
 22681/7561  
 22771/7591  
 22861/7621  
 22951/7651  
 23041/7681  
 23131/7711  
 23221/7741  
 23311/7771  
 23401/7801  
 23491/7831  
 23581/7861  
 23671/7891  
 23761/7921  
 23851/7951  
 23941/7981  
 24031/8011  
 24121/8041  
 24211/8071  
 24301/8101  
 24391/8131  
 24481/8161  
 24571/8191  
 24661/8221  
 24751/8251  
 24841/8281  
 24931/8311  
 25021/8341  
 25111/8371  
 25201/8401  
 25291/8431  
 25381/8461  
 25471/8491  
 25561/8521  
 25651/8551  
 25741/8581  
 25831/8611  
 25921/8641  
 26011/8671  
 26101/8701  
 26191/8731  
 26281/8761  
 26371/8791  
 26461/8821  
 26551/8851  
 26641/8881  
 26731/8911  
 26821/8941  
 26911/8971  
 27001/9001  
 27091/9031  
 27181/9061  
 27271/9091  
 27361/9121  
 27451/9151  
 27541/9181  
 27631/9211  
 27721/9241  
 27811/9271  
 27901/9301  
 27991/9331  
 28081/9361  
 28171/9391  
 28261/9421  
 28351/9451  
 28441/9481  
 28531/9511  
 28621/9541  
 28711/9571  
 28801/9601  
 28891/9631  
 28981/9661  
 29071/9691  
 29161/9721  
 29251/9751  
 29341/9781  
 29431/9811  
 29521/9841  
 29611/9871  
 29701/9901  
 29791/9931  
 29881/9961  
 29971/9991  
 30061/10021  
 30151/10051  
 30241/10081  
 30331/10111  
 30421/10141  
 30511/10171  
 30601/10201  
 30691/10231  
 30781/10261  
 30871/10291  
 30961/10321  
 31051/10351  
 31141/10381  
 31231/10411  
 31321/10441  
 31411/10471  
 31501/10501  
 31591/10531  
 31681/10561  
 31771/10591  
 31861/10621  
 31951/10651  
 32041/10681  
 32131/10711  
 32221/10741  
 32311/10771  
 32401/10801  
 32491/10831  
 32581/10861  
 32671/10891  
 32761/10921  
 32851/10951  
 32941/10981  
 33031/11011  
 33121/11041  
 33211/11071  
 33301/11101  
 33391/11131  
 33481/11161  
 33571/11191  
 33661/11221  
 33751/11251  
 33841/11281  
 33931/11311  
 34021/11341  
 34111/11371  
 34201/11401  
 34291/11431  
 34381/11461  
 34471/11491  
 34561/11521  
 34651/11551  
 34741/11581  
 34831/11611  
 34921/11641  
 35011/11671  
 35101/11701  
 35191/11731  
 35281/11761  
 35371/11791  
 35461/11821  
 35551/11851  
 35641/11881  
 35731/11911  
 35821/11941  
 35911/11971  
 36001/12001  
 36091/12031  
 36181/12061  
 36271/12091  
 36361/12121  
 36451/12151  
 36541/12181  
 36631/12211  
 36721/12241  
 36811/12271  
 36901/12301  
 36991/12331  
 37081/12361  
 37171/12391  
 37261/12421  
 37351/12451  
 37441/12481  
 37531/12511  
 37621/12541  
 37711/12571  
 37801/12601  
 37891/12631  
 37981/12661  
 38071/12691  
 38161/12721  
 38251/12751  
 38341/12781  
 38431/12811  
 38521/12841  
 38611/12871  
 38701/12901  
 38791/12931  
 38881/12961  
 38971/12991  
 39061/13021  
 39151/13051  
 39241/13081  
 39331/13111  
 39421/13141  
 39511/13171  
 39601/13201  
 39691/13231  
 39781/13261  
 39871/13291  
 39961/13321  
 40051/13351  
 40141/13381  
 40231/13411  
 40321/13441  
 40411/13471  
 40501/13501  
 40591/13531  
 40681/13561  
 40771/13591  
 40861/13621  
 40951/13651  
 41041/13681  
 41131/13711  
 41221/13741  
 41311/13771  
 41401/13801  
 41491/13831  
 41581/13861  
 41671/13891  
 41761/13921  
 41851/13951  
 41941/13981  
 42031/14011  
 42121/14041  
 42211/14071  
 42301/14101  
 42391/14131  
 42481/14161  
 42571/14191  
 42661/14221  
 42751/14251  
 42841/14281  
 42931/14311  
 43021/14341  
 43111/14371  
 43201/14401  
 43291/14431  
 43381/14461  
 43471/14491  
 43561/14521  
 43651/14551  
 43741/14581  
 43831/14611  
 43921/14641  
 44011/14671  
 44101/14701  
 44191/14731  
 44281/14761  
 44371/14791  
 44461/14821  
 44551/14851  
 44641/14881  
 44731/14911  
 44821/14941  
 44911/14971  
 45001/15001  
 45091/15031  
 45181/15061  
 45271/15091  
 45361/15121  
 45451/15151  
 45541/15181  
 45631/15211  
 45721/15241  
 45811/15271  
 45901/15301  
 45991/15331  
 46081/15361  
 46171/15391  
 46261/15421  
 46351/15451  
 46441/15481  
 46531/15511  
 46621/15541  
 46711/15571  
 46801/15601  
 46891/15631  
 46981/15661  
 47071/15691  
 47161/15721  
 47251/15751  
 47341/15781  
 47431/15811  
 47521/15841  
 47611/15871  
 47701/15901  
 47791/15931  
 47881/15961  
 47971/15991  
 48061/16021  
 48151/16051  
 48241/16081  
 48331/16111  
 48421/16141  
 48511/16171  
 48601/16201  
 48691/16231  
 48781/16261  
 48871/16291  
 48961/16321  
 49051/16351  
 49141/16381  
 49231/16411  
 49321/16441  
 49411/16471  
 49501/16501  
 49591/16531  
 49681/16561  
 49771/16591  
 49861/16621  
 49951/16651  
 50041/16681  
 50131/16711  
 50221/16741  
 50311/16771  
 50401/16801  
 50491/16831  
 50581/16861  
 50671/16891  
 50761/16921  
 50851/16951  
 50941/16981  
 51031/17011  
 51121/17041  
 51211/17071  
 51301/17101  
 51391/17131  
 51481/17161  
 51571/17191  
 51661/17221  
 51751/17251  
 51841/17281  
 51931/17311  
 52021/17341  
 52111/17371  
 52201/17401  
 52291/17431  
 52381/17461  
 52471/17491  
 52561/17521  
 52651/17551  
 52741/17581  
 52831/17611  
 52921/17641  
 53011/17671  
 53101/17701  
 53191/17731  
 53281/17761  
 53371/17791  
 53461/17821  
 53551/17851  
 53641/17881  
 53731/17911  
 53821/17941  
 53911/17971  
 54001/18001  
 54091/18031  
 54181/18061  
 54271/18091  
 54361/18121  
 54451/18151  
 54541/18181  
 54631/18211  
 54721/18241  
 54811/18271  
 54901/18301  
 54991/18331  
 55081/18361  
 55171/18391  
 55261/18421  
 55351/18451  
 55441/18481  
 55531/18511  
 55621/18541  
 55711/18571  
 55801/18601  
 55891/18631  
 55981/18661  
 56071/18691  
 56161/18721  
 56251/18751  
 56341/18781  
 56431/18811  
 56521/18841  
 56611/18871  
 56701/18901  
 56791/18931  
 56881/18961  
 56971/18991  
 57061/19021  
 57151/19051  
 57241/19081  
 57331/19111  
 57421/19141  
 57511/19171  
 57601/19201  
 57691/19231  
 57781/19261  
 57871/19291  
 57961/19321  
 58051/19351  
 58141/19381  
 58231/19411  
 58321/19441  
 58411/19471  
 58501/19501  
 58591/19531  
 58681/19561  
 58771/19591  
 58861/19621  
 58951/19651  
 59041/19681  
 59131/19711  
 59221/19741  
 59311/19771  
 59401/19801  
 59491/19831  
 59581/19861  
 59671/19891  
 59761/19921  
 59851/19951  
 59941/19981  
 60031/20011  
 60121/20041  
 60211/20071  
 60301/20101  
 60391/20131  
 60481/20161  
 60571/20191  
 60661/20221  
 60751/20251  
 60841/20281  
 60931/20311  
 61021/20341  
 61111/20371  
 61201/20401  
 61291/20431  
 61381/20461  
 61471/20491  
 61561/20521  
 61651/20551  
 61741/20581  
 61831/20611  
 61921/20641  
 62011/20671  
 62101/20701  
 62191/20731  
 62281/20761  
 62371/20791  
 62461/20821  
 62551/20851  
 62641/20881  
 62731/20911  
 62821/20941  
 62911/20971  
 63001/21001  
 63091/21031  
 63181/21061  
 63271/21091  
 63361/21121  
 63451/21151  
 63541/21181  
 63631/21211  
 63721/21241  
 63811/21271  
 63901/21301  
 63991/21331  
 64081/21361  
 64171/21391  
 64261/21421  
 64351/21451  
 64441/21481  
 64531/21511  
 64621/21541  
 64711/21571  
 64801/21601  
 64891/21631  
 64981/21661  
 65071/21691  
 65161/21721  
 65251/21751  
 65341/21781  
 65431/21811  
 65521/21841  
 65611/21871  
 65701/21901  
 65791/21931  
 65881/21961  
 65971/21991  
 66061/22021  
 66151/22051  
 66241/22081  
 66331/22111  
 66421/22141  
 66511/22171  
 66601/22201  
 66691/22231  
 66781/22261  
 66871/22291  
 66961/22321  
 67051/22351  
 67141/22381  
 67231/22411  
 67321/22441  
 67411/22471  
 67501/22501  
 67591/22531  
 67681/22561  
 67771/22591  
 67861/22621  
 67951/22651  
 68041/22681  
 68131/22711  
 68221/22741  
 68311/22771  
 68401/22801  
 68491/22831  
 68581/22861  
 68671/22891  
 68761/22921  
 68851/22951  
 68941/22981  
 69031/23011  
 69121/23041  
 69211/23071  
 69301/23101  
 69391/23131  
 69481/23161  
 69571/23191  
 69661/23221  
 69751/23251  
 69841/23281  
 69931/23311  
 70021/23341  
 70111/23371  
 70

Fig. 4

1/1	31/11	121/41	151/51	181/61	211/71	241/81	271/91	301/101	331/111	361/121	391/131	421/141	451/151	481/161	511/171	541/181	571/191	601/201	631/211	661/221	691/231	721/241	751/251	781/261	811/271	841/281	871/291	901/301	931/311	961/321	991/331	1021/341	1051/351	1081/361	1111/371	1141/381	1171/391	1201/401	1231/411	1261/421	1291/431	1321/441	1351/451	1381/461	1411/471	1441/481	1471/491	1501/501	1531/511	1561/521	1591/531	1621/541	1651/551	1681/561	1711/571	1741/581	1771/591	1801/601	1831/611	1861/621	1891/631	1921/641	1951/651	1981/661	2011/671	2041/681	2071/691	2101/701	2131/711	2161/721	2191/731	2221/741	2251/751	2281/761	2311/771	2341/781	2371/791	2401/801	2431/811	2461/821	2491/831	2521/841	2551/851	2581/861	2611/871	2641/881	2671/891	2701/901	2731/911	2761/921	2791/931	2821/941	2851/951	2881/961	2911/971	2941/981	2971/991	3001/1001	3031/1011	3061/1021	3091/1031	3121/1041	3151/1051	3181/1061	3211/1071	3241/1081	3271/1091	3301/1101	3331/1111	3361/1121	3391/1131	3421/1141	3451/1151	3481/1161	3511/1171	3541/1181	3571/1191	3601/1201	3631/1211	3661/1221	3691/1231	3721/1241	3751/1251	3781/1261	3811/1271	3841/1281	3871/1291	3901/1301	3931/1311	3961/1321	3991/1331	4021/1341	4051/1351	4081/1361	4111/1371	4141/1381	4171/1391	4201/1401	4231/1411	4261/1421	4291/1431	4321/1441	4351/1451	4381/1461	4411/1471	4441/1481	4471/1491	4501/1501	4531/1511	4561/1521	4591/1531	4621/1541	4651/1551	4681/1561	4711/1571	4741/1581	4771/1591	4801/1601	4831/1611	4861/1621	4891/1631	4921/1641	4951/1651	4981/1661	5011/1671	5041/1681	5071/1691	5101/1701	5131/1711	5161/1721	5191/1731	5221/1741	5251/1751	5281/1761	5311/1771	5341/1781	5371/1791	5401/1801	5431/1811	5461/1821	5491/1831	5521/1841	5551/1851	5581/1861	5611/1871	5641/1881	5671/1891	5701/1901	5731/1911	5761/1921	5791/1931	5821/1941	5851/1951	5881/1961	5911/1971	5941/1981	5971/1991	6001/2001	6031/2011	6061/2021	6091/2031	6121/2041	6151/2051	6181/2061	6211/2071	6241/2081	6271/2091	6301/2101	6331/2111	6361/2121	6391/2131	6421/2141	6451/2151	6481/2161	6511/2171	6541/2181	6571/2191	6601/2201	6631/2211	6661/2221	6691/2231	6721/2241	6751/2251	6781/2261	6811/2271	6841/2281	6871/2291	6901/2301	6931/2311	6961/2321	6991/2331	7021/2341	7051/2351	7081/2361	7111/2371	7141/2381	7171/2391	7201/2401	7231/2411	7261/2421	7291/2431	7321/2441	7351/2451	7381/2461	7411/2471	7441/2481	7471/2491	7501/2501	7531/2511	7561/2521	7591/2531	7621/2541	7651/2551	7681/2561	7711/2571	7741/2581	7771/2591	7801/2601	7831/2611	7861/2621	7891/2631	7921/2641	7951/2651	7981/2661	8011/2671	8041/2681	8071/2691	8101/2701	8131/2711	8161/2721	8191/2731	8221/2741	8251/2751	8281/2761	8311/2771	8341/2781	8371/2791	8401/2801	8431/2811	8461/2821	8491/2831	8521/2841	8551/2851	8581/2861	8611/2871	8641/2881	8671/2891	8701/2901	8731/2911	8761/2921	8791/2931	8821/2941	8851/2951	8881/2961	8911/2971	8941/2981	8971/2991	9001/3001	9031/3011	9061/3021	9091/3031	9121/3041	9151/3051	9181/3061	9211/3071	9241/3081	9271/3091	9301/3101	9331/3111	9361/3121	9391/3131	9421/3141	9451/3151	9481/3161	9511/3171	9541/3181	9571/3191	9601/3201	9631/3211	9661/3221	9691/3231	9721/3241	9751/3251	9781/3261	9811/3271	9841/3281	9871/3291	9901/3301	9931/3311	9961/3321	9991/3331	1001/3341	1004/3351	1007/3361	1010/3371	1013/3381	1016/3391	1019/3401	1022/3411	1025/3421	1028/3431	1031/3441	1034/3451	1037/3461	1040/3471	1043/3481	1046/3491	1049/3501	1052/3511	1055/3521	1058/3531	1061/3541	1064/3551	1067/3561	1070/3571	1073/3581	1076/3591	1079/3601	1082/3611	1085/3621	1088/3631	1091/3641	1094/3651	1097/3661	1100/3671	1103/3681	1106/3691	1109/3701	1112/3711	1115/3721	1118/3731	1121/3741	1124/3751	1127/3761	1130/3771	1133/3781	1136/3791	1139/3801	1142/3811	1145/3821	1148/3831	1151/3841	1154/3851	1157/3861	1160/3871	1163/3881	1166/3891	1169/3901	1172/3911	1175/3921	1178/3931	1181/3941	1184/3951	1187/3961	1190/3971	1193/3981	1196/3991	1199/4001	1202/4011	1205/4021	1208/4031	1211/4041	1214/4051	1217/4061	1220/4071	1223/4081	1226/4091	1229/4101	1232/4111	1235/4121	1238/4131	1241/4141	1244/4151	1247/4161	1250/4171	1253/4181	1256/4191	1259/4201	1262/4211	1265/4221	1268/4231	1271/4241	1274/4251	1277/4261	1280/4271	1283/4281	1286/4291	1289/4301	1292/4311	1295/4321	1298/4331	1301/4341	1304/4351	1307/4361	1310/4371	1313/4381	1316/4391	1319/4401	1322/4411	1325/4421	1328/4431	1331/4441	1334/4451	1337/4461	1340/4471	1343/4481	1346/4491	1349/4501	1352/4511	1355/4521	1358/4531	1361/4541	1364/4551	1367/4561	1370/4571	1373/4581	1376/4591	1379/4601	1382/4611	1385/4621	1388/4631	1391/4641	1394/4651	1397/4661	1400/4671	1403/4681	1406/4691	1409/4701	1412/4711	1415/4721	1418/4731	1421/4741	1424/4751	1427/4761	1430/4771	1433/4781	1436/4791	1439/4801	1442/4811	1445/4821	1448/4831	1451/4841	1454/4851	1457/4861	1460/4871	1463/4881	1466/4891	1469/4901	1472/4911	1475/4921	1478/4931	1481/4941	1484/4951	1487/4961	1490/4971	1493/4981	1496/4991	1499/5001	1502/5011	1505/5021	1508/5031	1511/5041	1514/5051	1517/5061	1520/5071	1523/5081	1526/5091	1529/5101	1532/5111	1535/5121	1538/5131	1541/5141	1544/5151	1547/5161	1550/5171	1553/5181	1556/5191	1559/5201	1562/5211	1565/5221	1568/5231	1571/5241	1574/5251	1577/5261	1580/5271	1583/5281	1586/5291	1589/5301	1592/5311	1595/5321	1598/5331	1601/5341	1604/5351	1607/5361	1610/5371	1613/5381	1616/5391	1619/5401	1622/5411	1625/5421	1628/5431	1631/5441	1634/5451	1637/5461	1640/5471	1643/5481	1646/5491	1649/5501	1652/5511	1655/5521	1658/5531	1661/5541	1664/5551	1667/5561	1670/5571	1673/5581	1676/5591	1679/5601	1682/5611	1685/5621	1688/5631	1691/5641	1694/5651	1697/5661	1700/5671	1703/5681	1706/5691	1709/5701	1712/5711	1715/5721	1718/5731	1721/5741	1724/5751	1727/5761	1730/5771	1733/5781	1736/5791	1739/5801	1742/5811	1745/5821	1748/5831	1751/5841	1754/5851	1757/5861	1760/5871	1763/5881	1766/5891	1769/5901	1772/5911	1775/5921	1778/5931	1781/5941	1784/5951	1787/5961	1790/5971	1793/5981	1796/5991	1799/6001	1802/6011	1805/6021	1808/6031	1811/6041	1814/6051	1817/6061	1820/6071	1823/6081	1826/6091	1829/6101	1832/6111	1835/6121	1838/6131	1841/6141	1844/6151	1847/6161	1850/6171	1853/6181	1856/6191	1859/6201	1862/6211	1865/6221	1868/6231	1871/6241	1874/6251	1877/6261	1880/6271	1883/6281	1886/6291	1889/6301	1892/6311	1895/6321	1898/6331	1901/6341	1904/6351	1907/6361	1910/6371	1913/6381	1916/6391	1919/6401	1922/6411	1925/6421	1928/6431	1931/6441	1934/6451	1937/6461	1940/6471	1943/6481	1946/6491	1949/6501	1952/6511	1955/6521	1958/6531	1961/6541	1964/6551	1967/6561	1970/6571	1973/6581	1976/6591	1979/6601	1982/6611	1985/6621	1988/6631	1991/6641	1994/6651	1997/6661	2000/6671	2003/6681	2006/6691	2009/6701	2012/6711	2015/6721	2018/6731	2021/6741	2024/6751	2027/6761	2030/6771	2033/6781	2036/6791	2039/6801	2042/6811	2045/6821	2048/6831	2051/6841	2054/6851	2057/6861	2060/6871	2063/6881	2066/6891	2069/6901	2072/6911	2075/6921	2078/6931	2081/6941	2084/6951	2087/6961	2090/6971	2093/6981	2096/6991	2099/7001	2102/7011	2105/7021	2108/7031	2111/7041	2114/7051	2117/7061	2120/7071	2123/7081	2126/7091	2129/7101	2132/7111	2135/7121	2138/7131	2141/7141	2144/7151	2147/7161	2150/7171	2153/7181	2156/7191	2159/7201	2162/7211	2165/7221	2168/7231	2171/7241	2174/7251	2177/7261	2180/7271	2183/7281	2186/7291	2189/7301	2192/7311	2195/7321	2198/7331	2201/7341	2204/7351	2207/7361	2210/7371	2213/7381	2216/7391	2219/7401	2222/7411	2225/7421	2228/7431	2231/7441	2234/7451	2237/7461	2240/7471	2243/7481	2246/7491	2249/7501	2252/7511	2255/7521	2258/7531	2261/7541	2264/7551	2267/7561	2270/7571	2273/7581	2276/7591	2279/7601	2282/7611	2285/7621	2288/7631	2291/7641	2294/7651	2297/7661	2300/7671	2303/7681	2306/7691	2309/7701	2312/7711	2315/7721	2318/7731	2321/7741	2324/7751	2327/7761	2330/7771	2333/7781	2336/7791	2339/7801	2342/7811	2345/7821	2348/7831	2351/7841	2354/7851	2357/7861	2360/7871	2363/7881	2366/7891	2369/7901	2372/7911	2375/7921	2378/7931	2381/7941	2384/7951	2387/7961	2390/7971	2393/7981	2396/7991	2399/8001	2402/8011	2405/8021	2408/8031	2411/8041	2414/8051	2417/8061	2420/8071	2423/8081	2426/8091	2429/8101	2432/8111	2435/8121	2438/8131	2441/8141	2444/8151	2447/8161	2450/8171	2453/8181	2456/8191	2459/8201	2462/8211	2465/8221	2468/8231	2471/8241	2474/8251	2477/8261	2480/8271	2483/8281	2486/8291	2489/8301	2492/8311	2495/8321	2498/8331	2501/8341	2504/8351	2507/8361	2510/8371	2513/8381	2516/8391	2519/8401	2522/8411	2525/8421	2528/8431	2531/8441	2534/8451	2537/8461	2540/8471	2543/8481	2546/8491	2549/8501	2552/8511	2555/8521	2558/8531	2561/8541	2564/8551	2567/8561	2570/8571	2573/8581	2576/8591	2579/8601	2582/8611	2585/8621	2588/8631	2591/8641	2594/8651	2597/8661	2600/8671	2603/8681	2606/8691	2609/8701	2612/8711	2615/8721	2618/8731	2621/8741	2624/8751	2627/8761	2630/8771	2633/8781	2636/8791	2639/8801	2642/8811	2645/8821	2648/8831	2651/8841	2654/8851	2657/8861	2660/8871	2663/8881	2666/8891	2669/8901	2672
-----	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------

